EINE NEUE METHODE ZUR THROMBOZYTENZÄHLUNG IM PERIPHEREN MIT DEM PARTIKELZÄHLGERÄT "COULTER COUNTER"

LEOPOLD BALLEISEN

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546014_0090

Aus dem Institut für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM
und dem Lehrstuhl für Innere Medizin, sepz. Hämatologie
der Universität, München
(Vorstand : Prof. Dr. W. Stich)

EINE NEUE MEHTODE ZUR THROMBOZYTENZÄHLUNG IM PERIPHEREN BLUT MIT DEM PARTIKELZÄHLGERÄT "COULTER COUNTER"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Leopold BALLEISEN
aus Freising

München 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Walther Stich
Mitberichterstatter: Prof. Dr.med. Rudolf Marx
Dekan: Prof. Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 1972

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

A) EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

B) MATERIAL UND METHODIK
- I. Das verwendete Material
  - 1. Der Coulter Counter
  - 2. Die Elektrolytlösung
  - 3. Sonstiges Gerät
- II. Methodik
  - 1. Der Arbeitsgang
    - a) Die Aufbereitung der Proben
    - b) Die Zweistufenmethode zur Thrombozytenzählung

C) ERGEBNISSE
- I. Der Einfluß von Reagenzröhrchen und Gläsern
- II. Der Einfluß der Zentrifugationstechnik
- III. Der Einfluß verschiedener Elektrolytgemische
- IV. Thrombozytenabtrennung mit Hilfe von Filtern
- V. Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzählung mit der 70µ Kapillare

D) BESPRECHUNG
- I. Gegenüberstellung der automatischen und visuellen Methoden
- II. Besprechung der automatischen Zählmethoden im Zusammenhang mit der eigenen Methodik
- III. Praktische Überlegungen
- IV. Technische Voraussetzungen
- V. Handhabung der Methode
- VI. Besprechung der Materialien
- VII. Besprechung der Reagenzien
- VIII. Überlegungen zur Wahl der geeigneten Kapillare für das Zählgerät
- IX. Mögliche Fehlerquellen
- X. Grenzen der Methode bezüglich der Thrombozytenkonzentration

XI. Anwendungsbereich

E) ZUSAMMENFASSUNG

ABBILDUNGEN

LITERATURVERZEICHNIS

COINCIDENCE CORECTION CARD

A) E I N L E I T U N G U N D F R A G E S T E L L U N G

Die Thrombozyten haben eine vielfältige Funktion innerhalb der Hämostase: Sie bringen die Blutgerinnung in Gang, üben einen direkten Einfluß auf die Blutgefäße aus und sind von Bedeutung bei der Verfestigung des Blutgerinnsels. Quantitative und qualitative Störungen der Thrombozyten können die Ursache schwerer Krankheitsbilder sein.
Es wurde deshalb schon seit mehreren Jahrzehnten versucht, die Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut zu bestimmen.
Die erste gebräuchliche Methode war die von KOCHER-FONIO: Sofortige Vermischung von einem Tropfen Blut aus der Fingerbeere nach Blutaustritt mit einem Tropfen Magnesiumsulfatlösung; Anfertigen eines Blutausstriches und Färben nach MAY - GRÜNWALD; Berechnen der Thrombozytenkonzentration entsprechend dem mikroskopisch bestimmten Verhältnis Erythrozytenzahl/Thrombozytenzahl und der Erythrozytenkonzentration/mm^3.
1950 wurde von BLACHER und CRONKITE eine neue Methode beschrieben: Sie verwendeten eine Erythrozytenpipette, in der Blut aus der Fingerbeere mit Ammoniumoxalatlösung vermischt wurde; die Thrombozytenzahl wurde in einer Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt.
Diese Methode wurde von FEISSLY und LÜDIN durch das Einführen einer kokainhaltigen Verdünnungsflüssigkeit verbessert, welche eine Thrombozytenagglutination verhindert, die Erythrozyten hämolysiert und somit eine direkte Thrombozytenzählung ermöglicht.
Zur Zeit allgemein üblich ist die von MARX und DERLATH modifizierte Methode unter Verwendung von Novocain und Titriplex zur Thrombozytenzählung: Bei der Bestimmung aus der Fingerbeere wird anstelle von Cocain Novocain benützt, das bei gleicher Wirksamkeit leich-

ter erhältlich ist; bei der Bestimmung aus Venenblut wird Titriplex als Antikoagulans benützt und daraus dann in der oben genannten Weise die Thrombozyten - zahl bestimmt.

Neue Methoden zur Thrombozytenbestimmung im peripheren Blut wurden in den letzten Jahren nach der Einführung automatischer Partikelzählgeräte entwickelt. Diese automatischen Zählgeräte finden seit der Einführung des Prinzips von COULTER 1956 zunehmend Verwendung. Sie nehmen heute im klinischen Routinegebrauch wie in vielen wissenschaftlichen Laboratorien einen wichtigen Platz ein. Ihr Vorteil gegenüber den Zählkammerverfahren liegt in der exakten Reproduzierbarkeit der Zählergebnisse und in der Verkürzung des Zählvorgangs. Die Methoden zur Leukozyten- und Erythrozytenzählung, sowie zur Bestimmung der Erythrozytenverteilungskurve haben sich schon seit einigen Jahren im täglichen Gebrauch bewährt. Auf anderen Gebieten wurden entsprechende Verfahren ausgearbeitet bzw. werden erprobt, z.B. in der zytologischen Tumordiagnostik (38); in der Mikrobiologie etwa zur quantitativen Bestimmung von Bakterien im Harn (22) oder zur Bestimmung von verschiedenen Noxen auf Bakterienkulturen (37); zur Untersuchung von Spermaproben (34); in der Meeresbiologie zur Zählung von Mikroorganismen. Ein wichtiger Anwendungsbereich ist auch die Bestimmung der Thrombozytenaggregation unter verschiedenen Bedingungen (15, 17). Die bisher entwickelten Methoden zur Thrombozytenzählung in automatischen Zählgeräten konnten sich im Routinegebrauch noch nicht durchsetzen, weil sie entweder zu umständlich und bzw. oder zu ungenau waren.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methode zu finden, welche qualitativ den Zählkammermethoden

gleichkommt, aber gleichzeitig die Vorteile der automatischen Zählgeräte ausnützt.
Außerdem sollte die Möglichkeit geprüft werden, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten mit der gleichen Kapillare des COULTER Zählgerätes zu messen.

B) M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

I. DAS VERWENDETE MATERIAL

1. D e r C o u l t e r C o u n t e r

Für alle unsere Versuche verwendeten wir das Partikelzählgerät Coulter Counter Modell "F" [1].
Das Prinzip der elektronischen Partikelzählung wurde als "electronic gating" bezeichnet: Zwei Glasgefäße, ein inneres und ein äußeres, sind über die Mikroöffnung einer kurzen Kapillare miteinander verbunden. Sie sind mit Elektrolytlösung gefüllt und enthalten jeweils eine Platinelektrode, die mit einer konstanten Gleichstromquelle verbunden ist. In der Düsenöffnung ist dann ein starkes elektrisches Feld vorhanden. Mit Hilfe einer Quecksilbersäule wird eine bestimmte Menge der Suspension (bei unserem Modell "F" 0,1 oder 0,5 ml) vom äußeren in das innere Gefäß gesaugt. Jedes durchtretende Teilchen - als relativer Nichtleiter - ruft einen bestimmten Spannungsabfall hervor, dessen Größe dem Volumen des Partikels proportional ist. Die Spannungsstöße werden vom Gerät registriert und können auf einer optischer Anzeige abgelesen werden; sie werden auch auf einen Oszillographen übertragen, erscheinen darauf als "peaks" und können so beurteilt werden. Die Größe der elektrischen Impulse ist direkt proportional der Stromgröße und der Verstärkung. Beide Größen können getrennt verändert und der zu messenden Partikelgröße so angepaßt werden, daß die Ausschläge innerhalb des

---

1) Coulter Electronics, InC. :
High Street South, Dunstable, Beds., England
(Deutsche Niederlassung: Krefeld)

regulierbaren Schwellenbereichs liegen. Da die Kapillare eine gewisse Länge hat, kommt es vor, daß zwei Partikel gleichzeitig durchtreten, die aber dem Prinzip entsprechend nur als ein Partikel registriert werden. Diese "coincidence" muß mit Hilfe von Korrekturtafeln ausgeglichen werden. Sie gelten jeweils für eine bestimmte Öffnungsgröße und die angesaugte Flüssigkeitsmenge.
Mit einer variablen Schwelleneinstellung ist es möglich, Impulse zu unterdrücken und das Gerät zu veranlassen, nur Impulse von einer bestimmten Größe an zu zählen.

2. Die Elektrolytlösung

Als Verdünnungsflüssigkeit verwendeten wir die von Coulter Electronics empfohlene 0,9%ige isotone Elektrolytlösung "Isoton". Sie hat als antibakteriellen Zusatz 0,1% NaN_3, welcher eine weitgehende Bakterienfreiheit des Systems und damit einen niedrigen "background" gewährleistet. Zu dieser Basisflüssigkeit kamen verschiedene, später noch genau zu erläuternde Zusätze.

3. Sonstiges Gerät

Zur Blutentnahme wurden Mikrokapillaren 0,01 ml von der Fa. Dade benutzt. Als Zentrifugengläser dienten übliche Glaszentrifugengläser mit einem Fassungsvermögen von 20 ml bzw. Reagenzröhrchen aus Polystyrol [1] (21, 5/100 mm). Zentrifugiert wurde in einer üblichen Laborzentrifuge.

---

1) Greiner und Söhne, 7440 Nürtingen

II. METHODIK

1. D e r A r b e i t s g a n g

a) Die Aufbereitung der Proben

In einem Reagenzröhrchen werden 20 ml Elektrolytlösung bereitgestellt. Mit einem Hämostilett wird in die Fingerbeere gestochen, der austretende Blutstropfen mit einer Mikrokapillare zu 0,01 aufgenommen und sofort in die bereitgestellte Lösung eingebracht oder nach Venenpunktion 4 ml Blut zu 1 ml Titriplexlösung aufgezogen, aus dieser Lösung dann mit der Mikrokapillare Blut entnommen und in Isoton eingebracht (Verdünnung 1:20 00). Die Suspension wird durch Schütteln gut gemischt und anschließend in einem Winkelaufsatz bzw. Einsätzen, die nur bis zu einem Winkel von 45° ausschwenken, zentrifugiert.

Über das Sediment hinweg, das sich seitlich am Röhrchen niederschlägt, wird fast vollständig in ein 20 ml - Coulterglas dekantiert. Nur der letzte Tropfen, der am Röhrchenrand hängenbleibt, wird verworfen, weil in ihm vermehrt Erythrozyten resuspendiert sind; die jetzt erythrozytenarme Lösung kann nach einmaligem Umkippen gemessen werden.

b) Die Zweistufenmethode zur Thrombozytenzählung

Diese Methode geht zurück auf SIPE und CRONKITE (35) und wird bei allen bisher bekannten Methoden zur Thrombozytenzählung mit dem Coulter Counter verwendet. Die Thrombozyten können bei keiner dieser Methoden ohne Verlust vollständig von den Erythrozyten getrennt werden. Um alle Thrombozyten erfassen zu können, muß daher ein gewisser Prozentsatz Erythrozyten in der Suspension toleriert werden. Beim Zählvorgang können die verbleibenden Erythrozyten mittels der variablen

Schwelleneinstellung abgetrennt werden.
Die Empfindlichkeit des Geräts wird durch Änderung der Stromstärke des Elektrodenstroms und der Verstärkung so eingestellt, daß die Höhe der Ausschläge auf dem Oszillographen etwa 1/3 der Gesamthöhe beträgt. Abzustimmen sind die Werte mit den bei der Erythrozyten- und Leukozytenzählung üblichen, da - nach den Angaben von P.W. HELLEMAN auf dem Internationalen Hämatologenkongress 1970 - die Stromgröße in einem niedrigen Bereich gehalten und bei Messung verschieden großer Teilchen und damit nötigen Einstellungsänderungen möglichst nur die Verstärkung verändert werden sollte. Wir lassen daher bei all unseren Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenmessungen die Stromstärke bei der Einstellung 3 konstant und verändern nur die übrigen Größen.
Die Meßpunkte für die Thrombozytenzählung können auf zwei verschiedenen Wegen gefunden werden: Üblicherweise verwendet man ein thrombozytenreiches Plasma, das nach der beschriebenen Methode gewonnen wurde. Seit kurzer Zeit gibt es ein stabiles Thrombozytenkonzentrat von Technicon [1], das ebenfalls zur Eichung und außerdem zur laufenden Kontrolle verwendet werden kann. Zur Messung wird eine 70µ - Kapillare verwendet; Durchflußvolumen 0,1 ml.
Eine typische Eichkurve erhält man durch fortlaufende Messung mit ansteigendem Schwellenwert; man findet ein Plateau bei einer niedrigen Schwelle (Thrombozyten und Erythrozyten) und ein zweites bei einer hohen Schwelle (nur Erythrozyten). Wir messen den hohen Wert am Beginn des ersten Plateaus, das ist bei uns etwa bei "threshold" 6 und den niederen Wert bei "threshold" 70. S. Abb. 2 und 3.

---

1) Platelet Reference N
Technicon GmbH Frankfurt/Main

Von dem abgelesenen Wert muß der Leerwert abgezogen, der so erhaltene Wert mit Hilfe der Coincidencetabelle (siehe Anhang) korrigiert und anschließend der 2. Wert vom 1. abgezogen werden. Entsprechend der Verdünnung (1:2000) und der gemessenen Menge (0,1 ml) wird dieser Wert mit 20 multipliziert. Man erhält die Thrombozytenzahl /mm^3.

C) E R G E B N I S S E

Wesentlichen Einfluß auf den Thrombozytenverlust während der Probenaufbereitung haben das Behältermaterial, die Art der Zentrifugation und die Zusammensetzung der Verdünnungsflüssigkeit.

I. DER EINFLUSS VON REAGENZRÖHRCHEN UND GLÄSERN

Wir untersuchten vergleichend vier Möglichkeiten, bei denen das aus der Fingerbeere entnommene Blut in folgenden Gläserkombinationen verarbeitet wurde:

1.) Unbehandelte Coulterglaschen 20 ml; Glaszentrifugengläser; dekantieren in ein 20 ml Coulterglas.
2.) Silikonisiertes Coulterglas 20 ml; silikonisiertes Zentrifugenglas; dekantieren in ein 20 ml Coulterglas.
   Silikonisiert wurde auf zwei Arten:
   a) 95% Benzin, 5% Silikonöl [1];
   b) Essigsäureäthylester und Propanol 1 : 1, 2% Silikonöl [1].
3.) Silikonisiertes Coulterglas; Polystyrol-Reagenzglas; dekantiert in unbehandeltes Coulterglas.
4.) Polystyrol-Reagenzglas; dekantiert in unbehandeltes Coulterglas.

Es bestand jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 1.) und 2.) und zwischen 2.) und 3.). Die Thrombozytenzahlen stiegen dabei von 1.) nach 3.) an. Zwischen 3.) und 4.) war kein statistischer Unterschied zu erheben, ebenso wie zwischen den beiden Arten zu silikonisieren. Wegen der vereinfachten Handhabung verwenden wir nun nur noch die mit Lösung gefüllten Reagenzröhrchen aus Polystyrol, in die das abgenommene Blut direkt eingebracht, darin aufbewahrt und zentrifugiert wird.

II. DER EINFLUSS DER ZENTRIFUGATIONSTECHNIK

Hinweise auf die Zentrifugationsgeschwindigkeit gaben die Arbeiten von ASTER (2), DILLARD(10), EASTAM (12) und EGGLETON (13). Sie beziehen sich allerdings alle auf die Separation von Thrombozyten in wenig verdünntem Blut. Wir mußten deshalb selbst empirisch die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeit ermitteln. Wegen des relativ geringen Unterschieds des spezifischen Gewichts von Erythrozyten und Thrombozyten und der allgemein schonenden Zentrifugation waren die besten Ergebnisse bei den niedrigen Geschwindigkeiten zu erwarten (Abb. 4).
Anzumerken ist, daß sich der Verlauf der Kurven je nach zugesetztem Reagenz verändert (Abb. 5). Die angegebenen Umdrehungszahlen sind nach der Formel

$$\text{RBZ (in Einheiten g)} = 11,18 \times r \times n^2$$

in g (Erdbeschleunigung) umgerechnet worden.
(r bedeutet den Schleuderradius in cm; n die minütliche Drehzahl dividiert durch 1000).
Wesentlich für den Erfolg der Methode ist die Verwendung eines Winkelaufsatzes in der Zentrifuge bzw. von Einsätzen, die lediglich ein Ausschwingen bis 45^0 erlauben (siehe Abb. 1). Mit freischwingenden Einsätzen wird ein völlig unbefriedigendes Ergebnis erzielt.

III. DER EINFLUSS VERSCHIEDENER ELEKTROLYTGEMISCHE

Trotz der von uns benützten Verdünnung, die selbst in gewissem Umfang die Aggregation von Thrombozyten vermindert (6, 40), mußten wir zunächst beim Zentrifugieren in reinem Isoton einen hohen Thrombozytenverlust von durchschnittlich etwa 30% und dazu eine große Fehlerbreite hinnehmen, so daß die Höhe des Verlustes nur schwer kalkulierbar war. Für die Hauptursache

halten wir vor allem den erhöhten Oberflächenreiz, der bei der Zentrifugation auf die Blutplättchen wirkt und sie veranlaßt zu aggregieren. Diese Aggregate werden beim Zählvorgang systembedingt entweder nur als ein Teilchen gezählt oder von einer bestimmten Größe an gar nicht mehr erfaßt. Außerdem ist bekannt, daß sich Thrombozyten an geschädigte Erythrozyten anlagern (23) und damit der Zählung ebenfalls verlorengehen.
Hinweise auf eventuell wirksame Substanzen entnahmen wir der Literatur über die Thromboseprophylaxe (3, 14, 20, 27, 28, 33, 36, 40), über die Trennung der Thrombozyten von Erythrozyten (2, 10) und der über die Thrombozytenzählung im Coulter Counter (3,11, 12, 13, 35).
Folgende Substanzen und Substanzgemische wurden geprüft: Acetylsalicylsäure (Merck-Reagenz), Eupaverin (Merck), Heparin (Liquemin - Roche), Papaverin-HCl (Merck-Reagenz , Persantin (Thomae), Novocain (Hoechst), EDTA Citrat, Periston-N (Bayer), Periston (Bayer).
Von diesen Substanzen schieden Acetylsalicylsäure, Eupaverin, Papaverin-HCl und Persantin schon in Vorversuchen wieder aus, weil sie entweder in Isoton nicht lösbar waren oder wieder ausfielen, wodurch eine Zählung von Thrombozyten in solchen Suspensionen unmöglich wurde.
Heparin vermindert in vitro nur in großen Konzentrationen die Aggregation der Thrombozyten; in niedrigen begünstigt es sie sogar (15). Auch wir erhielten bei unseren Tests keinen Hinweis auf eine günstige Wirkung.
Novocain hat zwar einen erythrozytenseparierenden Effekt, aber wegen seiner hämolytischen Eigenschaften einen schädigenden Einfluß auf die Thrombozyten bei unserer Methode. In einer Versuchsreihe mit 20 Vergleichswerten stellten wir einen starken Thrombozytenverlust in einem Isoton-Novocaingemisch (10:1) fest. (Tab. 1)

El.gem.	Zus.stz.	N	Sum.mit. C_k	Sum.mit. C_c	rel. Ausb.	Mitt.w. d.Diff.	Stand.abw. d.Einz.w.	Stand.abw. d.Mitt.w.	Signifikanz gegen 0
I:N	10:1	25	163	150	92%	-14,6	33,28	6,65	> 0,15
I:P	10:1	28	112	111	99%	-3,43	24,69	4,67	> 0,20
I:E	10:1	26	161	148	92%	-12,04	32,77	6,43	> 0,15
I:P:E									
a)Fing	22:2:1	13	151	150	99,5%	4,69	24,16	6,7	> 0,20
b)Venp	22:2:1	24	173	178	103%	- 1,83	14,59	2,97	> 0,20

Tab.1: Zusammenstellung der mit verschiedenen Elektrolytgemischen ermittelten Werte.

Die Werte entsprechen den Thrombozytenzahlen in Tausend. Die Prozentzahlen bezeichnen die relative Thrombozytenausbeute mit dem Coulter Counter gegenüber den Vergleichszählungen mit der Zählkammermethode (=100%). Die Signifikanz gegen 0 bedeutet für die aufgeführten Methoden, daß bei keiner ein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven besteht.
Abkürzungen: El.gem.= Elektrolytgemisch; Zus.stz.= Zusammensetzung; Sum.mit.= Summenmittel; Mitt.w.d.Diff.= Mittelwert der Differenz; Stand.abw.= Standardabweichung; Einz.w.= Einzelwerte; I= Isoton; P= Periston "Bayer"; E= Na_2-EDTA; Fing bzw. Venp = Blut aus der Fingerbeere bzw. gewonnen durch Venenpunktion. Wenn nicht eigens angegeben, wurde das Blut aus der Fingerbeere gewonnen.

Angeregt durch die Arbeiten von BULL (3) und GREBE (16) haben wir Polyvinylpyrrolidon in unsere Versuche mit einbezogen. BULL verwendete den Plasmaexpander Subtosan[1] (in Deutschland nicht im Handel) als BSG-beschleunigende Substanz, die als Hauptwirkstoff Polyvinylpyrrolidon enthält.
Eine ähnliche Zusammensetzung haben die von uns verwendeten Periston-N und Periston. Prinzipiell haben beide Lösungen eine ähnliche Wirkung. Periston-N scheidet trotzdem als brauchbare Substanz aus, weil die Erhöhung des "background" zu groß und ungleichmäßig ist, so daß die Ergebnisse unsicher werden und damit für eine Routinemethode nicht mehr tragbar sind. Periston-Lager hat diesen ungünstigen Einfluß nicht. In einer Versuchsreihe überprüften wir die Wirksamkeit als Zusatz zu Isoton im Verhältnis 1:10. Wir fanden dabei eine gute statistische Übereinstimmung mit den in der Zählkammer gefundenen Werten (Tab.1), sowie eine gute Korrelation. Die Regressionsgerade - y = 14,36 + 0,83x - (Abb.6) weist eine geringere Steigung auf als die Identitätslinie. Sie schneidet die Identitätslinie in Höhe des Abszissen- und Ordinatenwertes 103 000 in einem Winkel von 6°, so daß niedrige Thrombozytenkonzentrationen mit dem Coulter-Counter etwas höher und hohe Plättchenzahlen etwas niedriger als in der Zählkammer bestimmt werden.
Die Restvarianz, also die Varianz von y, nachdem der Einfluß der Streuung von x ausgeschaltet ist, beträgt $s^2_{xy} = \pm 0{,}43 \cdot x10^3$.
Citrat und EDTA sind längst als gut wirksame Antikoagulantien bekannt, wobei EDTA mehr Vorzüge auf

---

1) Société Parisienne d'Expansion Chemique - S.A.Specia

sich vereint (5, 10, 15, 23, 40). Wir haben in Vorversuchen dieselben Erfahrungen gemacht und deshalb mit Isoton/ Na_2-EDTA eine Versuchsreihe durchgeführt, deren Ergebnisse aber nicht befriedigend waren. Es wurde daraufhin die Kombination von Isoton mit Periston und EDTA im Verhältnis 22:2:1 in zwei Versionen getestet: In einer Reihe mit 13 Paaren verglichen wir die Werte nach Venenpunktion; in einer größeren mit 24 Paaren verglichen wir die Werte, welche mit Blut aus der Fingerbeere gewonnen waren. Die erhaltenen Werte zeigen bei beiden Versionen eine gute Übereinstimmung mit den bei der Kammerzählung ermittelten, was die Regressionsgeraden (Abb. 7 und 8) gut veranschaulichen.
Die für den Routinegebrauch vor allem relevante Methode mit Blut aus der Fingerbeere hat einen sehr engen Korrelationsfaktor von +0,976. Die Regressionsgerade: $y = -0,47 + 0,99x$ weist eine nur minimal geringere Steigung auf als die Identitätslinie; sie schneidet diese praktisch im Nullpunkt, so daß eine Abweichung der Thrombozytenkonzentration, die mit dem Coulter-Counter gewonnen wurde, von der in der Kammer festgestellten nicht zu erwarten ist. Die errechnete Abweichung liegt innerhalb der methodischen Fehlerbreite. Die Restvarianz beträgt $\pm$ 0,15 x 10^3. Die zweite Variante dieser Methode (Blut aus Venenpunktion) ergibt ein ähnliches Ergebnis. Die Werte sind wegen der geringen Zahl nur mit Vorbehalt zu betrachten.

IV. THROMBOZYTENABTRENNUNG MIT HILFE VON FILTERN

Neben der beschriebenen Methode, die stark verdünnte Lösung zu zentrifugieren, haben wir auch versucht, eine Trennung von Erythrozyten und Thrombozyten durch Filtrieren zu erreichen. Diese Möglichkeit schien durch den Größenunterschied von Thrombozyten und Erythrozyten gegeben zu sein. Wir verwendeten sili-

konisierte Injektionsspritzen mit Luer-Lockanschluß von Sartorius [1] und Filtrationsvorsätze von Sartorius und Millipore Filter GmbH [2].
Wir testeten Membranfilter von Sartorius mit der Porengröße 2 - 3µ und 4,5 - 6µ und von Millipore Filter GmbH mit der Porengröße von 5µ.
Trotz vieler verschiedener Versuchsanordnungen (Variation der Verdünnungen und Lösungszusammensetzung, Druckänderungen, wiederholtes Filtrieren derselben Lösung bzw. der Rückstände, Nachspülen mit reiner Lösungsflüssigkeit) erhielten wir nie mehr als im günstigsten Fall 60% der vorhandenen Thrombozytenzahl. Außerdem waren die Ergebnisse oft nur schwer zu reproduzieren. Wir haben deshalb diese Möglichkeit schließlich nicht mehr weiter verfolgt.

V. ERYTHROZYTEN-, LEUKOZYTEN- UND THROMBOZYTENZÄHLUNG MIT DER 70µ KAPILLARE

In der Laboratoriumsdiagnostik wurde der Coulter-Counter bisher hauptsächlich nur zur Leukozyten- und Erythrozytenzählung verwendet. Für diesen Zweck ist sowohl von der Herstellerfirma (9) als auch von verschiedenen Untersuchern (31) die 100µ - Kapillare empfohlen worden. Da es aber im Routinegebrauch nicht zumutbar ist, die Kapillaren fortlaufend zu wechseln, die 100µ - Kapillare für die Thrombozytenmessung wegen der dafür ungünstigen Größenverhältnisse aber nicht brauchbar ist, haben wir den Gebrauchswert der 70µ - Kapillare für die Erythrozyten- und Leukozytenzählung untersucht.
Es wurden hierzu zwei verschiedene Wege beschritten:
1.) Eichkurve mit einer Erythrotrol-Lösung [3],
2.) Vergleich mit einem Gerät, das mit einer 100µ - Kapillare ausgerüstet ist.

---

1) Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen
2) Millipore Filter GmbH, Neu - Isenburg
3) Merz und Dade AG, Bern

Wir fanden dabei eine günstige, im Normbereich liegende Einstellung für:
Erythrozyten: Attenuation 4, Aperture 8, Threshold 4
Leukozyten : Attenuation 4, Aperture 8, Threshold 7
Wir haben uns dabei von der von P.W. HELLEMAN gegebenen Empfehlung (Internationaler Hämatologenkongress 1970) leiten lassen, die Stromstärke in einem niedrigen Bereich zu halten und möglichst wenig zu verändern, um Störungen zu vermeiden. Es konnte erreicht werden, daß die Stromstärke überhaupt nicht verändert werden muß und alle Einstellungen durch Änderung der Verstärkungsregelung und des Schwellenwertes zu erreichen sind. Ermittelt wurden die Werte mit Hilfe von Eichkurven (Abb. 9 und 10). Diese ermittelten Einstellungen haben sich bei beiden Testvarianten bewährt. Die gute Übereinstimmung der beiden Geräte geht aus den Regressionsgeraden hervor (Abb. 11 und 12). Die Regressionskoeffizienten sind sowohl für die Erythrozyten- als auch für die Leukozytentestung sehr eng (r = 0,99 bzw. 0,97). Die Regressionsgerade für die Erythrozyten - y = 0,55 + 0,87x - weist eine etwas geringere Steigung auf als die Identitätslinie; sie schneidet diese in Höhe des Abszissen- und Ordinatenwertes 4,6 Mill. in einem Winkel von 3°, d.h., die 70µ - Kapillare mißt niedere Zellzahlen etwas höher als die 100µ - Kapillare und hohe etwas niederer. Die Restvarianz beträgt $\pm$ 0, 201 x 10^{6}. Die Regressionsgerade für die Leukozytenwerte - y = 18,26 + 1,02x - weist eine etwas stärkere Steigung als die Identitätslinie auf; sie schneidet diese in Höhe des Abszissen- und Ordinatenwertes 1430 in einem Winkel von 4°, so daß physiologische und hohe Leukozytenzahlen mit der 70µ - Kapilla re etwas höher als mit der 100µ - Kapillare bestimmt werden. Die Restvarianz beträgt $\pm$ 3,8 x 10^{1}.

Infolge der veränderten Kapillaröffnung ändert sich auch die Coincidence. Wir haben für unseren Gebrauch dazu neue Korrekturtafeln berechnet (siehe Tabellen im Anhang).

D) B E S P R E C H U N G

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß es möglich ist, mit einem automatischen Partikelzählgerät auf einfache Art Thrombozytenbestimmungen im peripheren Blut durchzuführen. Es handelt sich um ein Verfahren, das sowohl gegenüber den Zählkammer- bzw. Ausstrichverfahren als auch den bisher bekannt gewordenen automatischen Methoden Vorteile bietet.

I. GEGENÜBERSTELLUNG DER AUTOMATISCHEN UND VISUELLEN METHODEN

Die Vorzüge automatischer Zählgeräte gegenüber den visuellen Zählmethoden sind längst bekannt. Sie bestehen in der meist einfachen Handhabung und dem automatisch ablaufenden Zählvorgang, der unabhängig ist von der Fähigkeit der Bedienenden; dies trägt bei zur guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. So geben PRUDEN und WINSTEAD (31) für den Coulter-Counter eine dem Gerät inherente Abweichung von weniger als $\pm$ 2% an und von weniger als $\pm$ 7%, wenn man den Verdünnungsfehler mitberücksichtigt. GREBE u.a. (16) geben für ihre automatische Methode zur Thrombozytenzählung eine Streuung der Einzelwerte von $\pm$ 3%, BULL u.a. eine von $\pm$ 3,8% an. Demgegenüber hat man bei allen visuellen Methoden unter optimalen Bedingungen mindestens mit einer Streuung von 11% zu rechnen (6). Wir selbst haben für unsere Methode eine Fehlerbreite von $\pm$ 2,9% gefunden.

Eine große Bedeutung für die Praxis hat sicherlich auch die Zeitersparnis, die es - bei einer genügend großen Patientenzahl - gestattet, im Vergleich zu den üblichen Zählkammermethoden wenigstens das vierfache an Zählungen vorzunehmen. Selbst bei der Einzelzählung wird der Zeitgewinn deutlich: Von der Blutabnahme bis

zum Ergebnis muß man etwa 8 Minuten rechnen, während bei der günstigsten Version des Zählkammerverfahrens (nach MARX und DERLATH) etwa 20 Minuten veranschlagt werden müssen.

II. BESPRECHUNG DER AUTOMATISCHEN ZÄHLMETHODEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER EIGENEN METHODIK

Diesen Vorteil der Zeitersparnis hat unsere Methode auch gegenüber den anderen automatischen Methoden zur Thrombozytenbestimmung. Der große Zeitaufwand einiger dieser Methoden ist bedingt durch die langen Sedimentationszeiten, die zwischen 10 - 50 Minuten (8 / 16) und 2 - 3 Stunden (35 / 12) schwanken. Eine zweite Gruppe von Autoren (10/ 11/ 13/ 35) gibt verschiedene Methoden der Differenzialzentrifugation zur Trennung von Erythrozyten und Thrombozyten an. Ihr wesentlicher Nachteil liegt im Verlust von 10 - 30% der vorhandenen Blutplättchen, neben der insgesamt diffizilen Technik. Beiden Gruppen gemeinsam ist der Nachteil, mittels relativ komplizierter Formeln - wobei meist eine Hämatokritbestimmung notwendig ist - die Thrombozytenzahl/mm^3 errechnen zu müssen. Eine gewisse Sonderstellung nimmt die von GREBE u.a. angegebene Methode ein, bei der aber auch das Überstandsvolumen und die Gesamtverdünnung bei der Berechnung berücksichtigt werden müssen; der Verlust von etwa 5% Thrombozyten fällt weniger ins Gewicht.
Wir vermeiden die Nachteile beider Gruppen. Der Thrombozytenverlust liegt innerhalb des methodischen Fehlerbereiches. Hervorzuheben ist für unsere Methode weiterhin die einfache Handhabung, die es auch weniger Erfahrenen erlaubt, sie sicher anzuwenden.

III. PRAKTISCHE ÜBERLEGUNGEN

Die Voraussetzung für gute Ergebnisse ist sauberes Arbeiten und sorgfältiges Durchführen der Methode.
Vor allem müssen Verunreinigungen der Glas- und Plastikgefäße vermieden werden. Wir haben deshalb besondere Sorgfalt beim Spülen dieser Gefäße walten lassen: Nach dem Waschen in einer Reinigungslauge werden alle Behälter unter fließendem Wasser gut abgespült, dann in aqua dest. zweimal nachgespült und anschließend im Trockenschrank getrocknet.
Die Zentrifugengläser können lange vor der Blutabnahme mit der angegebenen Verdünnungsflüssigkeit gefüllt werden; wir haben dies schon Tage vorher getan. Einen Einfluß auf die Werte konnten wir auch nach tagelangem Stehen nicht feststellen.

IV. TECHNISCHE VORRAUSSETZUNGEN

Um einen günstigen Verdünnungsfaktor zu finden mußten mehrere Dinge berücksichtigt werden: Der günstige Zählbereich des Coulter-Counter liegt im Bereich von 1000 bis 30 000 "counts"; Werte darüber ergeben falsche Zahlen. Mikrokapillaren zur Blutabnahme stehen zur Verfügung zu 0,01, 0,02 und 0,05 ml. Die Durchflußmengen im Zählgerät betragen 0,1 oder 0,5 ml. Die Thrombozytenwerte von wenigen Tausend bis etwa 400 000/mm^3 sollen im günstigen Zählbereich liegen. Zu berücksichtigen war weiterhin, daß die zu messende Lösung nicht völlig erythrozytenfrei sein würde.
Wir fanden eine theoretisch günstige Verdünnung von 1:1 000. Diese war zunächst brauchbar. Während unserer Versuche hat sich dann die in der Praxis günstigere Verdünnung von 1:2 000 ergeben. Man kann damit nach dem Zentrifugieren vollständig dekantieren ohne sehr auf

die Erythrozyten achten zu müssen, die bei der geringeren Verdünnung immer aufgewirbelt wurden und dadurch in wechselnden Mengen mitdekantiert wurden. Die Menge der Erythryzyten hat einen gewissen Einfluß auf den Zählfehler. Wir haben eine Reduzierung der Erythrozyten auf etwas 1/25 des Ausgangswertes erreicht. Tolerabel sind Werte bis höchstens 1/15. Liegen die Erythrozytenwerte in der Meßlösung darüber, nimmt die Thrombozytenzahl schnell ab. Bei der geringeren Verdünnung (1:1 000) mußten häufiger größere Erythrozytenzahlen bei unvorsichtigem Dekantieren hingenommen werden. Für das Verhältnis von Thrombozyten zu Erythrozyten in dem von uns angegebenen Bereich haben wir keinen Einfluß auf das Ergebnis gefunden.
Wichtig für die Methode ist die Verwendung eines Winkelaufsatzes beim Zentrifugieren: Die geringere Wegstrecke für die Erythrozyten bis zum Niederschlag am Reagenzglas reduziert die Zentrifugierzeit wesentlich. Die Erythrozyten schlagen sich auf einer größeren Fläche nieder und fließen dann zusammen. Diese beiden Vorgänge tragen sicherlich dazu bei, Thrombozytenverlust zu vermeiden. Demgegenüber sind die Versuche mit freischwingenden Zentrifugeneinsätzen völlig unbefriedigend verlaufen und führten zu großen Thrombozytenverlusten.

V. HANDHABUNG DER METHODE

Die Blutabnahme erfolgt nach den üblichen Regeln:
Bei der Venenpunktion ist EDTA in der Spritze vorgegeben; das gewonnene Blut muß sofort mit dem Antikoagulans gut gemischt werden. Wir füllen dann in einen Plastikbehälter um und entnehmen daraus die benötigte Menge. Gewinnen wir - wie in der Routine üblich - das Blut aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen, so wird der erste Tropfen verworfen und erst der zweite aufgenommen. Das

so gewonnene Blut muß schnell verdünnt werden.
Diese Lösung kann sodann ohne Thrombozytenverlust über Stunden stehen bleiben, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, eine gewisse Anzahl von Proben gemeinsam auszuwerten. Als noch gut vertretbar erachten wir eine Aufbewahrungszeit von 7 - 8 Stunden (Tab.2).

Tab. 2: Konstanz über die Zeit

Zeit	10^{30}	13^{00}	14^{00}	16^{00}	16^{30}	17^{30}
Werte	206	214	206	220	222	212
	208	213	200	214	214	212

Verfolgt wurde die Zellzahl einer Blutprobe über einen Tag. In diesem Beispiel wurden alle Verdünnungen um 10 Uhr morgens hergestellt und jeweils zwei Proben zu den angegebenen Zeiten nach unserer Methode verarbeitet. Die angegebenen Werte sind die ermittelten Zellzahlen in Tausend.

Vor dem Zentrifugieren müssen die Proben aufgeschüttelt werden. Zum Zentrifugieren wird ein Winkelaufsatz benützt. Um die Laufzeit zu standardisieren, haben wir die Zeit erst vom Erreichen der Tourenzahl an gerechnet und dann nach Ablauf der vorgegebenen Zeit die Zentrifuge auslaufen lassen. Sofort nach dem Stehen der Zentrifuge muß dekantiert werden, weil der an der Gefäßwand haftende Erythrozytentropfen - der Schwerkraft folgend - nach unten rinnt und dann beim Dekantieren leicht resuspendiert. Die dann gewonnene Suspension ist wieder beständig und kann zu einem späteren Zeitpunkt verarbeitet werden.

Grundsätzlich haben wir uns bei der Handhabung des Coulter-Counter an die Regeln gehalten, die von PRUDEN und WINSTEAD (31) ausgearbeitet wurden.
Besonders hervorzuheben ist, daß vor allem die Kapillaröffnung sauber gehalten werden muß. Wegen der verringer-

ten Durchtrittsöffnung neigt sie leichter zum Verstopfen als dies bisher im Routinegebrauch üblich war. Vor jeder neuen Probe muß das System durchgespült werden, weil die verbleibenden Tropfen den folgenden Zählvorgang verfälschen können. Es ist außerdem günstig, immer den hohen Schwellenwert (Erythrozytenwert) zuerst zu messen, weil dann eventuell noch vorhandene Luftbläschen aufsteigen können und so nicht als Thrombozyten registriert werden. Werden diese Hinweise beachtet, genügt es für den Routinebetrieb, den Wert der hohen Schwelle nur einmal und den der niederen Schwelle zweimal zu messen und dann zu mitteln. Im übrigen ist der "Leercount" zu berücksichtigen.

Einige Bemerkungen sind noch zur Erstellung der Eichkurven und zum Festlegen der Schwelleneinstellung zu machen: Den Empfehlungen anderer Autoren zufolge (8) wird der erste Meßpunkt wie angegeben am Beginn des hohen Plateaus festgelegt; der zweite wird nach deren Empfehlung um eine Zehnerpotenz höher angenommen. Liegt der erste "threshold" bei 6, ist der zweite bei 60 festgelegt. Wie die Kontrolle mit dem Thrombozytenkonzentrat aber zeigte, erfaßt man bei dieser Einstellung noch einen geringeren Prozentsatz großer Thrombozyten mit, die dann bei der Berechnung vom ersten Wert abgezogen und damit ausgeschieden werden. Um dies zu vermeiden, haben wir die obige Regel erweitert, indem wir die Zahl der hohen Schwelle mit 10 multiplizieren und nochmals 10 hinzuzählen.

VI. BESPRECHUNG DER MATERIALIEN

Wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten, hat das Material der verwendeten Behälter einen deutlichen Einfluß auf das Zählergebnis. Dieser Einfluß war vor allem bei der Verwendung von Zentrifugengläsern aus

Polystyrol gegenüber solchen aus Glas festzustellen. Der Vorteil von Kunststoffen gegenüber Glas bei allen Arten der Thrombozytenaufbereitung ist seit langem bekannt. Bei unserer Methode liegt der Haupteffekt sicher in der Zentrifugationstechnik. Hier wirken starke Oberflächenreize auf die Thrombozyten ein, die in vivo und vitro diese veranlassen können, sich auszubreiten und untereinander zu vernetzen. Die Polystyroloberfläche der Reagenzgläser verhindert - zusammen mit den verwendeten Reagenzien - das Haften und Ausbreiten der Blutplättchen an der Gefäßoberfläche und vermeidet damit die Induktion der Aggregation. Der Mechanismus dieses Vorganges ist mit der veränderten Oberflächenladung des Gefäßes zu erklären: Die negativ geladene Thrombozytenoberfläche, die sonst über Ca^{++}- Ionen an die ebenfalls negativ geladene Glasoberfläche angelagert wird (28), findet auf diese Weise in der jetzt positiv geladenen Polystyroloberfläche keinen geeigneten Partner mehr. Dieser die Aggregation auslösende Schritt wird damit verhindert.

VII. BESPRECHUNG DER REAGENZIEN

Über die Wirkungsweise der Antikoagulantien bezüglich der Thrombozyten besteht eine reichhaltige Literatur. Für uns waren vor allem die in vitro wirksamen Substanzen interessant. Die für unsere Methode empirisch gefundenen gut brauchbaren Substanzen (Citrat, EDTA, Polyvinylpyrrolidon bzw. Periston) haben gut bekannte Wirkungsweisen, die sich in einer für uns günstigen Weise ergänzen. Sie gehören zu den wirksamsten Substanzen dieser Gruppe.

Im Nativblut haben Thrombozyten eine diskusähnliche Form; nach dem Zusatz von Citrat oder EDTA runden sich die Zellen ab und zwar nach EDTA vollständiger als nach

Citrat. Beide Substanzen verhindern weitgehend schon die Entwicklung der kleinen Fortsätze, die den ersten Schritt im Ablauf der Blutplättchenaggregation kennzeichnen. EDTA unterdrückt die Adhäsivität der Blutplättchen vollständiger als Citrat (5/ 40) und zwar unabhängig von der Art des auslösenden Reizes (ADP/ Prokollagen) bei physiologischen Thrombin- und Ca-Plasmawerten.

BORN und CROSS (5) geben als ausreichende Konzentration für Nativblut 0,03 Vol% einer 5%igen Na_2 - EDTA-Lösung an. Wird Citrat verwendet, muß die Konzentration wesentlich höher gewählt werden, weil nach GLYNN (15) eine Citratkonzentration unter 3,8% die Adhäsivität unter bestimmten Bedingungen sogar steigert. O'BRIEN (28) nennt eine kritische Konzentration von 0,38% - 1% : darunter wird nur die Verklumpung, nicht aber die Adhäsivität und Aggregation vermindert.

Ein entscheidender Effekt der Antikoagulantien ist die Veränderung der Oberflächenladung. Jede negativ geladene Oberfläche, wie Glas oder geschädigte Erythrozyten, verbindet sich leicht mit der ebenfalls negativ geladenen Thrombozytenoberfläche über Ca^{++} - Brücken. Man nimmt nun an, daß die positiv geladenen Antikoagulantien sich elektrostatisch an die negativen Oberflächen der Partikel anlagern und auf diese Weise den Wirkungsmechanismus der Ca-Ionen unterdrücken.

Zusammen mit der Polystyroloberfläche kann man so ein System von sich abstoßenden Oberflächen schaffen.

Eine für unsere Methode wichtige Eigenschaft hat Polyvinylpyrrolidon: Es beschleunigt die Erythrozytensedimentation und begünstigt damit die Abtrennung von den Thrombozyten. Diese Eigenschaft wurde bereits von GREBE (16) und BULL (8) bei ihren Methoden zur Thrombozytenzählung ausgenützt. Der Vorschlag, BSG-beschleunigende Substanzen zu verwenden, geht auf BUBE und

GMURZYNSKI (7) zurück. Der Mechanismus dieses Vorgangs ist unklar. Wir verwendeten die Substanz als Lösung des Plasmaexpanders "Periston" von BAYER, weil diese Lösung isoton vorliegt. Polyvinylpyrrolidon ist auch als Reinsubstanz (Merck - Reagenz) erhältlich.

VIII. ÜBERLEGUNGEN ZUR WAHL DER GEEIGNETEN KAPILLARE FÜR DAS ZÄHLGERÄT

Die Partikeldurchmesser sollen nach Angaben der Firma Coulter zwischen 2% und etwa 40% des Kapillardurchmessers betragen. Normale Thrombozyten haben einen Durchmesser zwischen 1,8 und 3,6µ. Der größte Teil der Zellen liegt bei einer 100µ - Kapillare mit 2,3µ an der untersten Grenze des Meßbereiches, ein Teil sogar darunter. Wir haben deshalb die 70µ - Kapillare gewählt, da bei dieser auch die Erythrozyten und Leukozyten im günstigen Zählbereich liegen. Unsere Vergleichsuntersuchungen haben diese Überlegungen voll bestätigt (Abb. 9 - 12). Wie die Regressionsgeraden zeigen, haben sich die mit Hilfe der Eichkurven gefundenen Einstellungen bewährt. Wir können somit empfehlen, für die genannten Untersuchungen anstelle der bisher üblichen 100µ - Kapillare die 70µ - Kapillare zu verwenden.

IX. MÖGLICHE FEHLERQUELLEN

Die mit Abstand wichtigsten Fehlerquellen sind Verdünnungsfehler. Sie verursachen 98% aller Fehler bei Bestimmungen mit automatischen Zählgeräten (31). Nur 1,21% sind auf Störungen des elektrischen Systems zurückzuführen. Die genannten Zahlen sind vorwiegend bei Leukozyten- und Erythrozytenzählungen ermittelt worden. Bei der Thrombozytenzählung dürften sich die Fehlerhäufigkeiten etwas durch eine weitere Fehlerquelle verschieben: Verunreinigungen der Verdünnungsflüssigkeit

und ungenügend gereinigtes Behältermaterial lassen den "background" in unvorhersehbarem Ausmaß anwachsen und verfälschen daher die Resultate. Eine wichtige Vorbedingung für die optimale Anwendung der Methode ist deshalb das Vermeiden jeglicher Verunreinigungen in allen Phasen des methodischen Ablaufs.
Eine - sicher sehr seltene - Fehlermöglichkeit haben wir einmal während unserer Versuche beobachten können: Bei einem Patienten mit einem Lymphoblastom (150 000 Lymphozyten/mm^3) erhielten wir einen falsch hohen Wert (87 000 anstatt 43 000 Thrombozyten/mm^3); ein geringer Teil der kleinen Lymphozyten war demnach mitgezählt worden. Ohne dieses Ergebnis weiter zu diskutieren, wollen wir nur auf diese Möglichkeit hinweisen.
Wir haben sonst nie einen Hinweis auf falsch positive oder negative Werte aus einem ähnlichen Grund erhalten, obwohl ein Teil der Patienten aus einer hämatologischen Ambulanz stammte. Soweit wir das jetzt beurteilen können, ist unsere Methode weitgehend unempfindlich gegen Störungen, die durch pathologische Blutbestandteile ausgelöst werden könnten.

X. GRENZEN DER METHODE BEZÜGLICH DER THROMBOZYTEN - KONZENTRATION

Bis zum oberen Normbereich von etwa 400 000 Thrombozyten/mm^3 ist die Methode der Wahl (Isoton mit Periston und EDTA; zentrifugieren bei 85g - 5 Min.) sehr gut brauchbar. Oberhalb dieser Werte tritt ein zunehmender Thrombozytenverlust auf, der aber auch bei ganz hohen Werten von etwa 800 000 Thrombozyten/mm^3 15% nicht überschreitet. Sollen solche ganz hohen Werte genau bestimmt werden, so empfehlen wir eine Neubestimmung mit der doppelten oder auch mehrfachen Verdünnung.

XI. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode ist besonders im Hinblick auf den Routinebetrieb entwickelt worden. Sie ist besonders vorteilhaft bei größeren Fallzahlen, wie sie im täglichen Klinikbetrieb und deren Ambulanz oder in großen Praxen auftreten. Mit Vorteil ist sie überall da anzuwenden, wo auch Leukozyten- und Erythrozytenbestimmungen mit einem automatischen Partikelzählgerät vorgenommen werden.

E) Z U S A M M E N F A S S U N G

Seit der Einführung automatischer Partikelzählgeräte wurde ihr Anwendungsbereich auf viele Gebiete ausgedehnt. Es erfolgte auch die Entwicklung neuer Methoden zur Thrombozytenzählung, die sich aber wegen ihrer Umständlichkeit oder Ungenauigkeit nicht durchsetzen konnten. Wir haben deshalb versucht, einen neuen Weg bei der Suche nach einer für die Praxis geeigneten automatischen Methode zur Thrombozytenzählung zu finden, bei der - im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Methoden - sofort nach der Blutentnahme die endgültige Verdünnung (1:2 000) hergestellt wird.
In einer kurzen Darstellung wird auf das Prinzip des Coulter Counter eingegangen und das verwendete Modell "F" beschrieben, soweit es für das Verständnis der Methode nötig ist. Auch die Elektrolytlösung und das sonstige Gerät werden dargestellt.
Eingehend wird dann die Methodik erläutert: Die Aufbereitung der Proben umfaßt die Blutabnahme, das Verdünnen, Zentrifugieren und Dekantieren. Die Thrombozytenzählung wird mit der Zweistufenmethode mittels zweier Schwellen vorgenommen, wodurch die in der Lösung verbliebenen Erythrozyten abgetrennt werden können. Zwei Wege zur Ermittlung dieser Schwelleneinstellung werden angegeben.
Unsere eigenen Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1.) Das Material der verwendeten Reagenzgläschen und Zentrifugengläser hat einen Einfluß auf das Ergebnis. Reagenzgläser aus Polystyrol sind unbehandelten und silikonisierten Gläsern eindeutig überlegen.
2.) Die Zentrifugationstechnik ist ein wesentlicher Teil unserer Metnode. Mittels großer Untersuchungsreihen wurde die günstigste Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit ermittelt. Sie liegt bei 5 Minuten

und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 85g. Zentrifugiert wird in einem Winkelaufsatz.

3.) Entscheidend für unsere Methode wurde die Suche nach Reagenzien, welche die Trennung der Thrombozyten von den Erythrozyten auf irgendeine Weise begünstigen. Eingehend untersucht wurden Novocain, Citrat, EDTA, Periston-N und Periston. Einzeln und in verschiedenen Kombinationen wurden sie der Basisflüssigkeit "Isoton" in variierten Konzentrationen zugesetzt. Als günstigste Kombination wurde Isoton mit Periston und EDTA im Verhältnis 22:2:1 gefunden.

4.) Wir haben eine weitere Methode zur Thrombozytenabtrennung mit Hilfe von Membranfiltern erprobt. Nach vielen vergeblichen Versuchsanordnungen wurde diese Möglichkeit schließlich nicht mehr weiter verfolgt.

5.) Zur Thrombozytenzählung mit dem Coulter Counter ist eine 70µ - Kapillare zu verwenden. Erythrozyten und Leukozyten werden üblicherweise mit einer 100µ - Kapillare gezählt. Wir konnten zeigen, daß alle Zählungen mit einer 70µ - Kapillare durchgeführt werden können. Unsere Vergleichsuntersuchungen ergaben eine gute Übereinstimmung zwischen den mit einer 70µ- und den mit einer 100µ - Kapillare ermittelten Werten.

In der folgenden Besprechung werden zunächst automatische und visuelle Methoden gegenübergestellt und unsere eigene mit den übrigen automatischen verglichen. Es schließen sich Überlegungen zur Praxis und den technischen Voraussetzungen an. Erläutert wird dann die Handhabung der Methode, wobei nochmals Hinweise zu deren Gebrauch gegeben werden. Eingehend besprechen wir die verwendeten Materialien und Reagenzien; insbesondere wird deren Wirkungsmechanismus diskutiert. Abschließend werden Überlegungen angestellt über mögliche Fehlerquellen, die Grenzen der Methode und deren günstigsten Anwendungsbereich.

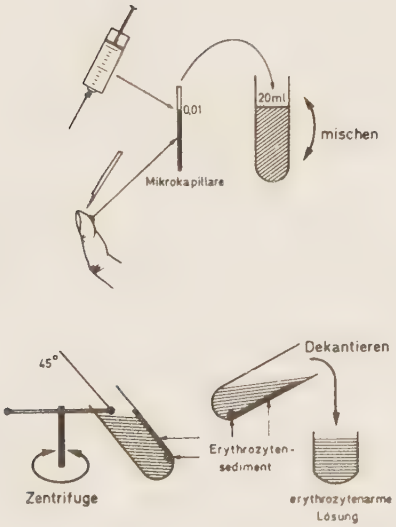

Abb. 1: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung zur Gewinnung einer erythrozytenarmen Lösung.
Erklärung siehe Text.

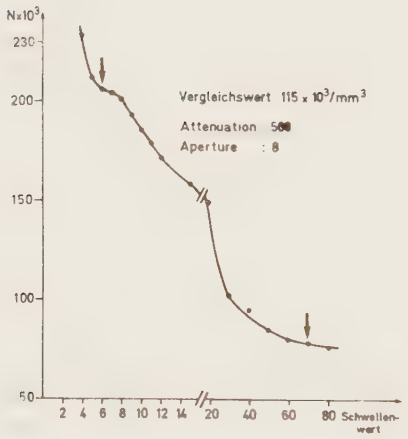

Abb.2: Eichkurve zur Thrombozytenzählung aus Nativblut. Der Zählkammer-Vergleichswert wurde nach MARX und DERLATH bestimmt. Die Pfeile geben die ermittelten Schwellenwerte an.

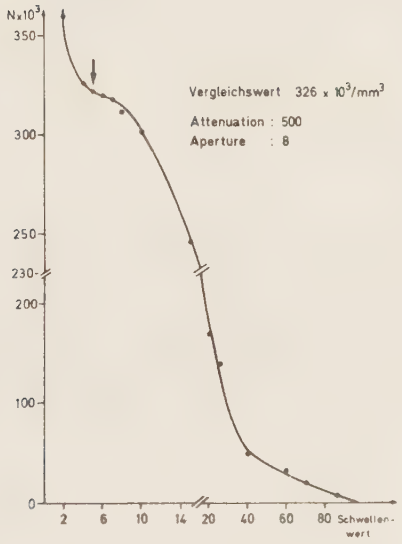

Abb. 3: Eichkurve zur Thrombozytenzählung mit standardisiertem Thrombozytenkonzentrat.

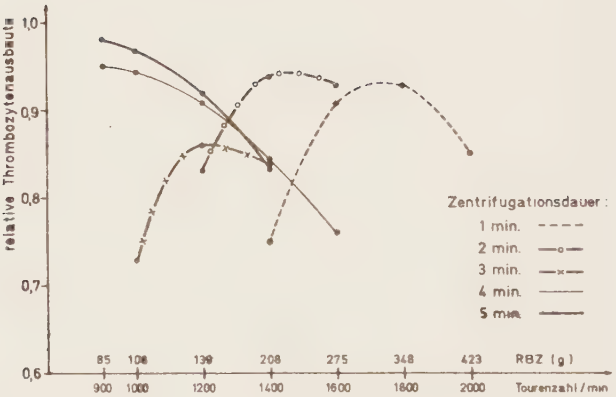

Abb.4: Einfluß der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf die relative Thrombozytenausbeute. Verwendetes Elektrolytgemisch: Isoton mit Periston-Bayer (10:1). Die einzelnen Werte wurden jeweils aus 16 bis 24 Werten gemittelt.

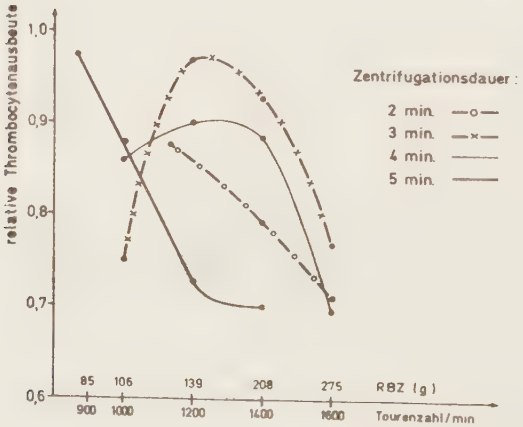

Abb.5: Einfluß der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf die relative Thrombozytenausbeute. Verwendetes Elektrolytgemisch: Isoton mit Periston-N(Bayer).

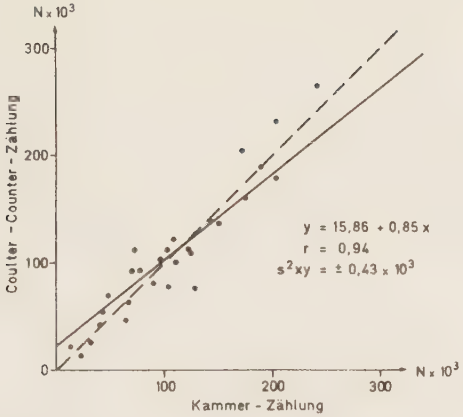

Abb.6: Regressionsgerade für die Thrombozytenzählung: Darstellung der Beziehung zwischen den Zählergebnissen des Coulter Counters und mikroskopischer Zählung. Elektrolytgemisch: Isoton:Periston = 10:1. In der Abb. sind 26 Werte gegeneinander aufgetragen, die sich jeweils aus je 2-3 Einzelzählungen ergaben. Ausgezogene Linie: Regressionsgerade; gestrichelte Linie: Identitätslinie.

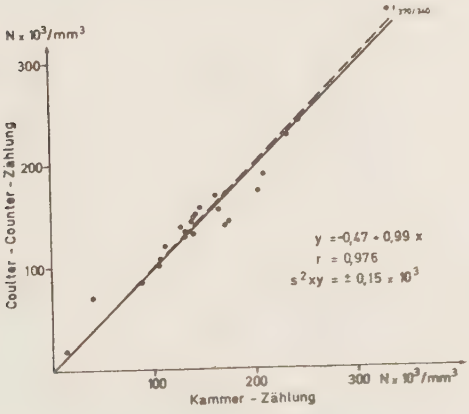

Abb.7: Beziehung zwischen der Thrombozytenzählung mit dem Coulter Counter und der mikroskopischen Zählung. Regressionsgerade für das Elektrolytgemisch Isoton: Periston:EDTA = 22:2:1.
Variante 1: Blut aus der Fingerbeere
Im übrigen verfuhren wir wie in Abb.6 beschrieben.
In der Abb. sind 24 Werte gegeneinander aufgetragen.

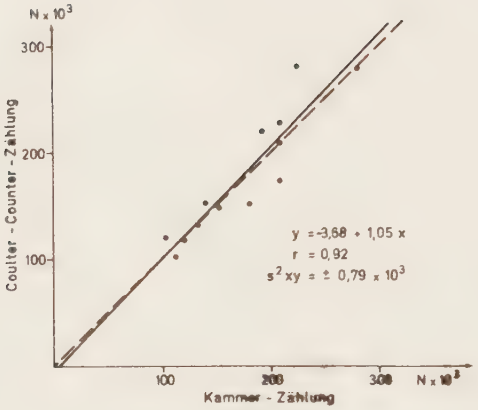

Abb.8: Beziehung zwischen der Thrombozytenzählung mit dem Coulter Counter und der mikroskopischen Zählung. Regressionsgerade für das Elektrolytgemisch Isoton: Periston: EDTA = 22:2:1.
Variante 2: Blut aus Venenpunktion
In der Abb. sind 13 Werte gegeneinander aufgetragen. Im übrigen verfuhren wir wie in Abb.6 beschrieben.

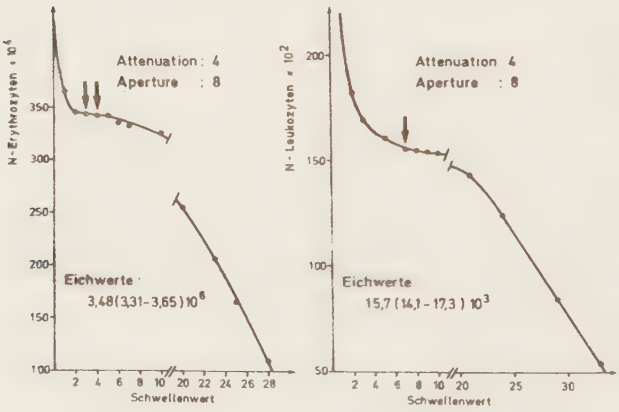

Abb. 9: Eichkurve zur Erythrozytenzählung und

Abb.10: Eichkurve zur Leukozytenzählung
Die Pfeile geben die für die Messung gewählten Schwellenwerte an.

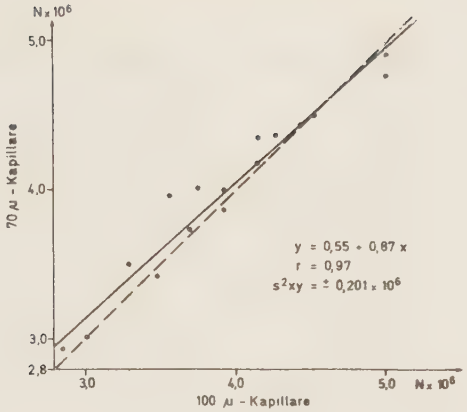

Abb. 11: Regressionsgerade für die Erythrozytenzählung: Darstellung der Beziehung zwischen den Zählergebnissen einer 70u- und einer 100u - Kapillare. In der Abb. sind 16 Ergebnispaare gegeneinander aufgetragen. Es handelt sich dabei um Mittelwerte, die sich aus jeweils mindestens 2 Einzelzählungen ergaben.
Ausgezogene Linie: Regressionsgerade
Gestrichelte Linie: Identitätslinie.

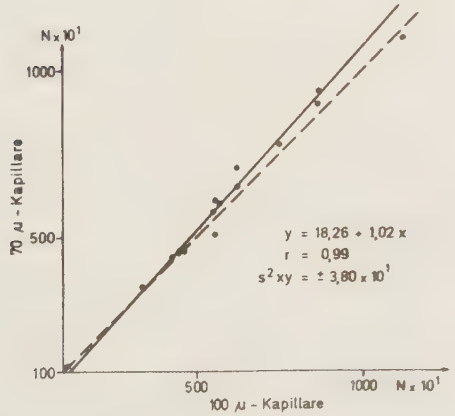

Abb. 12: Regressionsgerade für die Leukozytenzählung: Darstellung der Beziehung zwischen den Zählergebnissen einer 70u- und einer 100u - Kapillare. In der Abb. sind 15 Ergebnispaare gegeneinander aufgetragen.
Im übrigen siehe Abb. 11.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ARFORS, K.E., H.C.HINT, D.P.DHALL, N.A.MATHESON: Counteraction of platelet activity at sites of laser-induced endothelial trauma. Brit.med. J. 4, 430 (1968).
2. ASTER, H.R., J.H.Jandl: Platelet sequestration in man. J.clin.Invest. 43, No.5, 843 (1964).
3. BAKER,H.: Aspirin and platelet aggregation. The Lancet 27, 204 (1968).
4. BLEIFELD,W., G.GEHRMANN: Über die Bedeutung der radioaktiven Markierung von Thrombozyten mit ^{51}Cr in der Diagnostik von Thrombozytopenien. Dtch.Med.Wschr. 91, 1594 (1966).
5. BORN,G.V.R., M.J.Cross: The aggregation of blood platelets. J. Physiol. 168, 178 (1963).
6. BRECHER,G., M.Schneiderman, E.P.Cronkite: The reproducibility and constancy of the platelet count. Am. J. clin. Path. 23, 15 (1953).
7. BUBE,F.W., Z.GMURZYNSKI: A simple method to achieve accumulation of leukozytes. Vox Sang. 11, 238 (1966).
8. BULL,B.S., M.A.SCHNEIDERMAN, G.BRECHER: Platelet counts with the Coulter Counter. Am. J. clin. Path. 44, Nr. 4, 678 (1964).
9. COULTER ELECTRONICS, INC: Instruction and service manual for the model "F". 5th edition 4 - 67.
10. DILLARD, G.H.L., G.BRECHER, E.P.CRONKITE: Separation, concentration and transfusion of platelets. Proc.Soc. Expetl. Biol. Med. 73, 796 (1951).
11. EASTHAM,R.D.: Rapid whole-blood platelet counting using an electronic particle counter. J. clin. Path. 16, 163 (1963).
12. EASTHAM,R.D.: Simple method for separating platelets from red cells befor enumeration with an electronic counter. J. clin. Path. 18, 248 (1965).
13. EGGLETON,M.J., A.A.SHARP: Platelet counting using the Coulter electronic counter. J. clin. Path. 16, 164 (1963).

14. EVANS,G., M.A.PACKHAM, E.E.NISHIZAWA, J.F.NUSTARD, E.A.MURPHY: The effect of acetylsalicylic acid on platelet function. J.expert.Med. 123, 877 (1968).
15. GLYNN,M.F., H.Z.MOVAT, E.A.MURPHY, J.F.MUATARD: Study of platelet adhesivesniss and aggregation, with latex particles. J. Lab. Clin. Med. 65/2, 179 (1965).
16. GREBE,D., I.AUGUSTIN, H.K.WELLMER: Eine Methode zur Zählung von Thrombozyten in einem automatischen Partikelzählgerät. Blut 19, 202 (1969).
17. HEINRICH,D., L.ROKA: Methode zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation. Klin.Wschr. 48,235 (19707.
18. HINKEL,G.K., W.ROSE, P.WUNDERLICH: Über die elektronische Blutzellzählung mit dem "TUR" ZG. 1. Mitteilung Dt. Gesundheitswesen 21, 371 (1966).
19. HINKEL,G.K., W.ROSE, P.WUNDERLICH: Über die elektronische Blutzellzählung mit dem "TUR" ZG1. 3.Mitteilung Dt. Gesundheitswesen 21, 1909 (1966).
20. JOIST,J.H.: Medikamentöse Hemmung der Blutplättchenfunktion. Med.Welt, 21, 1247 (1970).
21. KISSMEYER-NIELSEN,F.: Platelets in blood stored in untreated and siliconed glass bottles and plastic bags. J.clin.Path. 14, 626 (1961).
22. KUBITSCHEK,H.E.: Electronic counting and sizing of bacteria. Nature 182, 234 (1958).
23. LANCASTRE,F., J.GINESTE, B.MAUÜIN: Numérations des hématies, des leucocytes et des plaquettes du sang au moyen d´un computeur électronique de particules. Sésnce du 15, 521 (1965).
24. MARX,R. (Herausgeber): Der Thrombozyt. Bd.6 Hämatologie und Bluttransfusion (Herausgeber: W.STICH und G.ROTENSTROTH-BAUER), J.F.Lehmann-Verlag München (1969).
25. MARX,R., S.DERLATH: Über eine Methode zur vergleichend quantitativen Bestimmung der Thrombozytenadhäsivität an blutn. Oberflächen unter gleichzeitiger Erfassung der relativen Blutviskosität. Blut 3, 247 (1957).

26. MAYR,K.: Erfahrungen mit dem Coulterschen Blutkörperchenzählgerät. Wien. klin. Wschr. 77, 702 (1965).
27. O'BRIEN,J.R.: Effect of anti-inflammatory agents on platelets. The Lancet 27, 894 (1968).
28. O'BRIEN,J.R.: The adhesivisnis of native platelets and its prevention. J. clin. Path. 14, 140 (1961).
29. O'Brien,J.R.: Platelet aggregation. J. clin. Path. 15, 446 (1962).
30. PINCKARD,R.N., D.HAWKINS,R.S.FARR: In vitro acetylation of plasma proteins, enzymes and DNA by aspirin. Nature 219, 68 (1968).
31. PRUDEN,E.L., A.WISTEAD: Accuracy control of blood cell counts with the Coulter Counter. Am. J. Med. Tech., Jan-Feb, (1964).
32. ROMEIS,B.: Mikroskopische Technik, 16.Auflage, R.Oldenburg Verlag, München-Wien 1968.
33. SCHARRER,I., M.SCHEPPING, K.BREDDIN: Thromboseprophylaxe mit Aspirin ? Klin. Wschr. 47, 1318 (1969).
34. SEGAL,S.J., K.A.LAURENCE: Automatic analysis of particulate matter in human semen. Ann.N.Y. Acad.Sci. 99, 271 (1964).
35. SIPE,C.R., E.P.CRONKITE: studies on the application of the Coulter electronic counter in enumeration of platelets. Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, Art.2, 262 (1962).
36. STUART,R.K.: Platelet function studies in human beings receiving 300 mg of aspirin per day. J. Lab. Med. 75, No.3, 463 (1970).
37. SWANTON,E.M., W.A.CURBY, H.E.LIND: Experiences with the Coulter counter in bacteriology. Appl. Microbiol. 10, No.5, 480 (1962).
38. VAILLANT,H.W., R.M.RICHARD: Anapraisal of the electronic particle counter as a screening technic for cervical neoplasia. Am. J. clin. Path. 45,172 (1966).

39. WEISS,H.J., L.M.ALEDORT: Impaired platelet/connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. The Lancet 2, 495 (1967).
40. ZUCKER,M.B., J.BORELLI: Reversible alterations in platelet morphology produced by antikoagulants and by cold. Blood J. Haemat. 9, 602 (1954).

COINCIDENCE CORECTION CARD

Berechnung für: 70µ Kapillare, 0,1 ml Volumen ; F=4,385.

51	52	101	105	151	161	201	219	251	279	301	340	351	405		
52	53	102	107	152	162	202	220	252	280	302	342	352	406		
53	54	103	108	153	163	203	221	253	281	303	343	353	407		
54	55	104	109	154	164	204	222	254	282	304	344	354	409		
55	56	105	110	155	166	205	223	255	283	305	346	355	410		
56	57	106	111	156	167	206	224	256	284	306	347	356	411		
57	58	107	112	157	168	207	226	257	286	307	348	357	413		
58	59	108	113	158	169	208	227	258	287	308	350	358	414		
59	61	109	114	159	170	209	228	259	288	309	351	359	416		
60	62	110	115	160	171	210	229	260	289	310	352	360	417		
61	63	111	116	161	172	211	230	261	291	311	354	361	418		
62	64	112	117	162	273	212	232	262	292	312	355	362	420		
63	65	113	119	163	175	213	233	263	293	313	356	363	421		
64	66	114	120	164	176	214	234	264	295	314	358	364	423		
65	67	115	121	165	177	215	235	265	296	315	359	365	424		
66	68	116	122	166	178	216	236	266	297	316	360	366	425		
67	69	117	123	167	179	217	237	267	298	317	362	367	426		
68	70	118	124	168	180	218	239	268	299	318	363	368	428		
69	71	119	125	169	182	219	240	269	301	319	364	369	429		
70	72	120	126	170	183	220	241	270	302	320	366	370	430		
71	73	121	127	171	184	221	242	271	303	321	367	371	431		
72	74	122	129	172	185	222	244	272	304	322	369	372	433		
73	75	123	130	173	186	223	245	273	306	323	370	373	434		
74	76	124	131	174	187	224	246	274	307	324	371	374	435		
75	77	125	132	175	188	225	247	275	308	325	372	375	437		
76	79	126	133	176	190	226	248	276	309	326	374	376	438		
77	80	127	134	177	191	227	250	277	311	327	375	377	439		
78	81	128	135	178	192	228	251	278	312	328	376	378	441		
79	82	129	136	179	193	229	252	279	313	329	377	379	442		
80	83	130	137	180	194	230	253	280	314	330	378	380	443		
81	84	131	139	181	195	231	254	281	315	331	379	381	444		
82	85	132	140	182	196	232	256	282	317	332	380	382	446		
83	86	133	141	183	197	233	257	283	318	333	382	383	447		
84	87	134	142	184	198	234	258	284	319	334	383	384	448		
85	88	135	143	185	199	235	259	285	321	335	384	385	450		
86	89	136	144	186	200	236	260	286	322	336	386	386	451		
87	90	137	145	187	201	237	262	287	323	337	387	387	452		
88	91	138	146	188	202	238	263	288	324	338	388	388	454		
89	92	139	147	189	203	239	264	289	326	339	389	389	455		
90	94	140	149	190	205	240	265	290	327	340	391	390	456		
91	95	141	150	191	206	241	266	291	328	341	392	391	457		
92	96	142	151	192	207	242	268	292	329	342	394	392	459		
93	97	143	152	193	208	243	269	293	331	343	395	393	460		
94	98	144	153	194	209	244	270	294	332	344	396	394	461		
95	99	145	154	195	210	245	271	295	333	345	398	395	463		
96	100	146	155	196	212	246	272	296	334	346	399	396	464		
97	101	147	156	197	213	247	274	297	336	347	400	397	465		
98	102	148	158	198	214	248	275	298	337	348	401	398	467		
99	103	149	159	199	215	249	276	299	338	349	402	399	468		
100	104	150	160	200	216	250	277	300	339	350	403	400	470		

COINCIDENCE CORRECTION CARD (0,1 ml)

401	471	451	540	501	612	551	685	601	658	651	837	701	916
402	472	452	541	502	613	552	686	602	760	652	839	702	918
403	474	453	543	503	615	553	688	603	762	653	841	703	920
404	475	454	544	504	616	554	689	604	764	654	842	704	921
405	477	455	545	505	618	555	691	605	765	655	844	705	923
406	478	456	546	506	619	556	692	606	767	656	845	706	925
407	479	457	548	507	620	557	693	607	770	657	846	707	926
408	481	458	549	508	622	558	695	608	771	658	848	708	927
409	482	459	550	509	623	559	696	609	773	659	849	709	929
410	483	460	552	510	624	560	697	610	775	660	850	710	931
411	485	461	553	511	626	561	699	611	777	661	852	711	933
412	486	462	555	512	627	562	700	612	779	662	854	712	935
413	487	463	556	513	629	563	701	613	780	663	855	713	937
414	489	464	557	514	630	564	703	614	782	664	857	714	938
415	491	465	559	515	632	565	705	615	783	665	858	715	940
416	492	466	560	516	633	566	706	616	785	666	859	716	942
417	494	467	562	517	635	567	708	617	786	667	861	717	944
418	495	468	563	518	636	568	709	618	787	668	863	718	945
419	497	469	565	519	637	569	711	619	788	669	865	719	947
420	498	470	566	520	639	570	712	620	790	670	867	720	948
421	499	471	567	521	640	571	714	621	791	671	868	721	950
422	501	472	568	522	642	572	715	622	793	672	870	722	952
423	502	473	570	523	644	573	717	623	795	673	871	723	954
424	503	474	572	524	646	574	718	624	796	674	873	724	955
425	505	475	573	525	647	575	720	625	798	675	874	725	957
426	506	476	575	526	649	576	721	626	799	676	876	726	959
427	507	477	576	527	650	577	723	627	801	677	877	727	960
428	509	478	578	528	651	578	724	628	802	678	879	728	962
429	510	479	579	529	652	579	725	629	804	679	880	729	963
430	511	480	580	530	653	580	727	630	806	680	882	730	965
431	512	481	582	531	654	581	728	631	807	681	883	731	967
432	514	482	583	532	656	582	730	632	809	682	885	732	969
433	515	483	585	533	658	583	731	633	810	683	887	733	971
434	516	484	586	534	659	584	733	634	811	684	888	734	972
435	518	485	587	535	660	585	734	635	812	685	889	735	974
436	519	486	589	536	662	586	736	636	814	686	891	736	976
437	521	487	590	537	663	587	738	637	815	687	893	737	978
438	522	488	592	538	671	588	739	638	817	688	895	738	979
439	523	489	593	539	673	589	741	639	818	689	897	739	981
440	525	490	595	540	675	590	742	640	819	690	898	740	982
441	526	491	596	541	669	691	744	641	821	691	899	741	984
442	527	492	598	542	671	592	745	642	822	692	901	742	986
443	529	493	599	543	673	593	747	643	824	693	902	743	988
444	530	494	600	544	575	594	743	644	825	694	904	744	989
445	532	495	602	545	676	595	749	645	827	695	906	745	991
446	533	496	603	546	678	596	750	646	829	696	907	746	993
447	535	497	604	547	679	597	752	647	830	697	909	747	995
448	536	498	606	548	681	598	753	648	832	698	911	748	996
449	537	499	607	549	682	599	755	649	834	699	912	749	997
450	539	500	609	550	533	600	757	650	836	700	914	750	999

COINCIDENCE CORRECTION CARD

Berechnung für: 70µ Kapillare, 0,5 ml

$$C = F \times \left(\frac{N}{1000}\right)^2; \quad N_{corr} = N_{uncorr} + C; \quad F = 0{,}8575$$

101	101	151	153	201	204	251	256	301	309	351	361	401	414
102	102	152	154	202	205	252	257	302	310	352	362	402	415
103	103	153	155	203	207	253	258	303	311	353	363	403	416
104	104	154	156	204	208	254	259	304	312	354	365	404	417
105	105	155	157	205	209	255	260	305	313	355	366	405	418
106	107	156	158	206	210	256	261	306	314	356	367	406	419
107	108	157	159	207	211	257	262	307	315	357	368	407	420
108	109	158	160	208	212	258	263	308	316	358	369	408	421
109	110	159	161	209	213	259	264	309	317	359	370	409	422
110	111	160	162	210	214	260	265	310	318	360	371	410	423
111	112	161	163	211	215	261	267	311	319	361	372	411	424
112	113	162	164	212	216	262	268	312	320	362	373	412	427
113	114	163	165	213	217	263	269	313	321	363	374	413	428
114	115	164	166	214	218	264	270	314	322	364	375	414	429
115	116	165	167	215	219	265	271	315	324	365	376	415	430
116	117	166	168	216	220	266	272	316	325	366	377	416	431
117	118	167	169	217	221	267	273	317	326	367	379	417	432
118	119	168	170	218	222	268	274	318	327	368	380	418	433
119	120	169	171	219	223	269	275	319	328	369	381	419	434
120	121	170	172	220	224	270	276	320	329	370	382	420	435
121	122	171	173	221	225	271	277	321	330	371	383	421	436
122	123	172	175	222	226	272	278	322	331	372	384	422	437
123	124	173	176	223	227	273	279	323	332	373	385	423	438
124	125	174	177	224	228	274	280	324	333	374	386	424	439
125	126	175	178	225	229	275	281	325	334	375	387	425	440
126	127	176	179	226	230	276	283	326	335	376	388	426	441
127	128	177	180	227	231	277	284	327	336	377	389	427	442
128	129	178	181	228	232	278	285	328	337	378	390	428	444
129	130	179	182	229	233	279	286	329	338	379	391	429	445
130	131	180	183	230	235	280	287	330	339	380	392	430	446
131	132	181	184	231	236	281	288	331	340	381	393	431	447
132	133	182	185	232	237	282	289	332	341	382	394	432	448
133	135	183	186	233	238	283	290	333	342	383	396	433	449
134	136	184	187	234	239	284	291	334	342	384	397	434	450
135	137	185	188	235	240	285	292	335	345	385	398	435	451
136	138	186	189	236	241	286	293	336	346	386	399	436	452
137	139	187	190	237	242	287	294	337	347	387	400	437	453
138	140	188	191	238	243	288	295	338	348	388	401	438	454
139	141	189	192	239	244	289	296	339	349	389	402	439	456
140	142	190	193	240	245	290	297	340	350	390	403	440	457
141	143	191	194	241	246	291	298	341	351	391	404	441	458
142	144	192	195	242	247	292	299	342	352	392	405	442	459
143	145	193	196	243	248	293	300	343	353	393	406	443	460
144	146	194	197	244	249	294	301	344	354	394	407	444	461
145	147	195	198	245	250	295	302	345	355	395	408	445	462
146	148	196	199	246	251	296	303	346	356	396	409	446	463
147	149	197	200	247	252	297	304	347	357	397	410	447	464
148	150	198	201	248	253	298	235	343	358	398	411	448	465
149	151	199	202	249	254	299	236	349	359	399	412	449	466
150	152	200	203	250	255	300	308	350	360	400	414	450	468

COINCIDENCE CORRECTION CARD (0,5 ml)

451	469	501	522	551	577	601	632	651	687	701	743
452	470	502	524	552	578	602	633	652	688	702	744
453	471	503	535	553	579	603	634	653	689	703	745
454	472	504	526	554	580	604	635	654	691	704	746
455	473	505	527	555	581	605	636	655	692	705	747
456	474	506	528	556	582	606	637	656	693	706	748
457	475	507	529	557	584	607	639	657	694	707	750
458	476	508	530	558	585	608	640	658	695	708	751
459	477	509	531	559	586	609	641	659	696	709	752
460	478	510	532	560	587	610	642	660	697	710	753
461	479	511	533	561	588	611	643	661	698	711	754
462	480	512	534	562	589	612	644	662	699	712	755
463	481	513	536	563	590	613	645	663	701	713	756
464	482	514	537	564	591	614	646	664	702	714	758
465	483	515	538	565	592	615	647	665	703	715	760
466	485	516	539	566	593	616	648	666	704	716	760
467	486	517	540	567	594	617	649	667	705	717	761
468	487	518	541	568	596	618	650	668	706	718	762
469	488	519	542	569	597	619	652	669	707	719	763
470	489	520	543	570	598	620	653	670	708	720	764
471	490	521	544	571	599	621	654	671	710	721	766
472	491	522	545	572	600	622	655	672	711	722	767
473	492	523	546	573	601	623	656	673	712	723	768
474	493	524	548	574	602	624	657	674	713	724	769
475	494	525	549	575	603	625	658	675	714	725	770
476	495	526	550	576	604	626	659	676	715	726	771
477	496	527	551	577	605	627	660	677	716	727	772
478	497	528	552	578	607	628	662	678	717	728	774
479	499	529	553	579	608	629	663	679	718	729	775
480	500	530	554	580	609	630	664	680	720	730	776
481	501	531	555	581	610	631	665	681	721	731	777
482	502	532	556	582	611	632	666	682	722	732	778
483	503	533	557	583	612	633	667	683	723	733	779
484	504	534	558	584	613	634	668	684	724	734	780
485	505	535	560	585	614	635	669	685	725	735	782
486	506	536	561	586	615	636	671	686	726	736	783
487	507	537	562	587	616	637	672	687	727	737	784
488	508	538	563	588	618	638	673	688	728	738	785
489	509	539	564	589	619	639	674	689	729	739	786
490	511	540	565	590	620	640	675	690	731	740	787
491	512	541	566	591	621	641	676	691	732	741	788
492	513	542	567	592	622	642	677	692	733	742	789
493	514	543	568	593	623	643	678	693	734	743	791
494	515	544	569	594	624	644	679	694	735	744	792
495	516	545	570	595	625	645	681	695	746	745	793
496	517	546	572	596	626	646	682	696	737	746	794
497	518	547	573	597	627	647	683	697	738	747	795
498	519	548	574	598	629	648	684	698	739	748	796
499	520	549	575	599	630	649	685	699	740	749	797
500	521	550	576	600	631	650	686	700	742	750	798

Herrn Prof. Dr. W. Stich, dem Direktor des Institutes für Hämatologie der GSF, Assoziation mit EURATOM, danke ich für die Möglichkeit, daß ich in seinem Institut in so großzügiger Weise meine Doktorarbeit durchführen konnte. Für die weitreichende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bin ich Herrn Dr. M. Schmid zu Dank verpflichtet. Fräulein Kettler habe ich zu danken für ihre Hilfe bei der Beschaffung des Materials.

L E B E N S L A U F

Am 25. April 1943 wurde ich in Freising als Sohn des Dipl. Ing. für Obstbau Leopold Balleisen und seiner Ehefrau Maria geboren.
Die Volksschule besuchte ich von 1949 bis 1954 zunächst in Laufen, dann in Altötting. Anschließend trat ich in Burghausen in das Hum. Gymnasium ein. Von 1958 bis zum Abitur 1964 besuchte ich das Hum. Gymnasium in Traunstein.
In der Bundeswehr diente ich zwei Jahre bis zur Entlassung als Leutnant d.R. 1966.
Im Herbst desselben Jahres wurde ich in München zum Medizinstudium zugelassen, wo ich seit dem Wintersemester 1966/67 studierte. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Frühjahr 1969, das medizinische Staatsexamen im Juni 1972.
Seit 1968 bin ich mit meiner Ehefrau Ruth verheiratet. Unsere Tochter Bettina wurde im März 1969 geboren.